



PCRRun™

## Kit para Detecção Molecular de DNA de *Anaplasma platys* em cães

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30CAP104 **Instruções de uso**

### FINALIDADE

O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

### PRINCÍPIO

O Kit de Detecção Molecular PCRRun® destina-se à detecção de *Anaplasma platys* em DNA **isolado de sangue total** com kit de extração de DNA PCRRun **30PRE104**. O kit deve ser empregado durante uma infecção ativa e contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar um teste fácil e preciso.

### ESTOCAGEM E MANUSEIO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição direta de luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar.
- Não submeter a altas temperaturas

### Precauções:

- Para evitar contaminação de DNA na reação, sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRRun das embalagens seladas de alumínio, somente imediatamente antes da sua utilização.
- Retornar os tubos de reação PCRRun não utilizados para a embalagem de alumínio original, juntamente com o dessecante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número de lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes números de lote.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil, destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.
- Realizar a extração de DNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun

### INFORMAÇÕES

*Anaplasma platys* é uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória alocada à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*<sup>1</sup>. A bactéria é o agente causador da Trombocitopenia Cíclica Infeciosa Canina (ICCT), uma doença que se supõe ser transmitida pela picada de carrapatos infectados. Os cães são os hospedeiros mais comuns, embora raros relatos de infecção em gatos tenham sido documentados<sup>2</sup>. As infecções que ocorrem naturalmente podem resultar em doença clínica leve a grave. O *Anaplasma platys* ataca as plaquetas, danificando o sistema normal de coagulação do sangue. Durante a fase de bacteremia inicial, a contagem de plaquetas é reduzida e alguns caninos demonstram evidências clínicas de sangramento. Os sintomas desta infecção podem incluir febre, depressão, sangramento do nariz ou da boca, membranas mucosas pálidas, hemorragias petequiais e linfadenopatia. Após a transmissão do carrapato, os cães podem permanecer subclínicamente infectados e abrigar cronicamente a bactéria por meses sem apresentar sintomas da doença. A infecção pode não se tornar aparente até que o sistema imunológico do cão seja enfraquecido por fatores como estresse ou condições adicionais da doença.

### DIAGNÓSTICO

As anormalidades hematológicas em cães com anaplasmoses incluem

trombocitopenia, que é a anormalidade laboratorial mais consistente. Em casos graves, a anemia também está presente. Durante a bacteremia e subsequente trombocitopenia, a contagem de plaquetas pode cair abaixo de 20.000/μL. Um diagnóstico pode ser feito pela detecção microscópica de *A. platys morulae*. Quando presentes, esses corpos de inclusão podem ser vistos dentro de plaquetas em esfregaços de sangue corados com Giemsa ou esfregaços de pelagem amarelada. Devido à parasitemia cíclica, que pode ocorrer em intervalos de 1 a 2 semanas, o patógeno geralmente está ausente ou presente em números muito baixos. Por esse motivo, a análise microscópica não é confiável e muitas vezes pode levar a resultados falsos negativos. Além disso, resultados falsos positivos podem ocorrer quando artefatos semelhantes a corpos de inclusão são confundidos com *A. platys morulae*. Os achados bioquímicos podem incluir hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, fosfatase alcalina plasmática elevada ou hiperbilirrubinemia. Pode ocorrer coinfeção com patógenos caninos adicionais transmitidos por vetores. Esse estado pode exacerbar a gravidade da doença e alterar a apresentação clínica, resultando em diagnóstico, tratamento e prognóstico complicados. Um protocolo de Teste de Anticorpos Fluorescentes Indireto (RIFI) foi desenvolvido para a detecção de anticorpos séricos para *A. platys*. A soroprevalência é alta em áreas endêmicas, portanto, um diagnóstico não pode ser baseado em um único título positivo (que pode refletir apenas a exposição anterior). Durante as infecções agudas iniciais, os anticorpos podem ser inaparentes. Um aumento mínimo de quatro vezes nos títulos de anticorpos é essencial para confirmar o diagnóstico. Amostras de soro pareadas coletadas com pelo menos duas a três ou mais semanas de intervalo são imperativas para avaliação. Métodos como PCRRun® podem ser empregados para a detecção precisa de *A. platys* quando a parasitemia é baixa. Ensaios baseados em PCR realizados adequadamente são o método mais sensível e preciso para a detecção de anaplasmoses causada por *A. platys* durante os estágios parasitêmicos cíclicos agudos e posteriores<sup>3</sup>.

### CONTEÚDO DO KIT

| Conteúdo                                                                           | Quantidade |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tira PCRRun® de 4 tubos de reação simples com <i>pellets</i> liofilizados          | 1          |
| Embalagem de alumínio com o dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável. | 4          |
| Pipetas capilares de plástico - 20 μL*                                             | 5          |

\* Pipetas calibradas e ponteiros com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

### EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de DNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR.
- Bloco de aquecimento (é comercializado pela Biogal)
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

### COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é adequado para detectar ácido nucleico extraído de 50 μL de sangue total, com EDTA de preferência. Utilizando o Kit de Extração Rápida de DNA PCRRun® Sample Prep (Cat No. 30PRE104). Os anticoagulantes sanguíneos têm uma consequência substancial nas reações de PCR, portanto, é imperativo que o volume ideal de sangue seja coletado conforme indicado no tubo. Para obter melhores resultados, amostras adquiridas recentemente e extratos de DNA recém-preparados são recomendados para uso com o kit PCRRun®. A menos que recomendado de outra forma, amostras e extratos de DNA podem ser mantidos a 2-8°C por até 24 horas ou -20°C por um período de tempo maior.

## PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Limpe a área de trabalho para o ensaio com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

- DNA extraído da amostra com extrator de DNA nº30PRE104;
- Embalagem com os tubos de reação;
- Pipetas capilares para 20 µL de volume;
- Marcador de ponta fina;

3. Ligue o bloco de aquecimento e ajustar a 60°C. Assim que o bloco atingir a temperatura, prossiga.

4. Retire e destaque os tubos necessários para a reação PCRun® da embalagem. Quatro tubos individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando uma tesoura pequena e limpa, destacar o número necessário de tubos sem abrir as tampas. Tomar cuidado para retornar os tubos não utilizados para o envelope de alumínio e selar completamente com fita adesiva para manter um ambiente seco. Bata o tubo verticalmente e suavemente sobre uma superfície plana e firme para que todo o conteúdo desça ao fundo do tubo. A pequena pastilha branca deve estar localizada na parte inferior do tubo.

5. Identifique os tubos com o número de cada amostra.

6. Abra cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a pipeta capilar descartável de 20 µL, pipete 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCRun® e transfira-o para o tubo de reação. Confira se todo o conteúdo da pipeta capilar foi transferido corretamente ao tubo. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida para trazer todo o fluido para o fundo do mesmo. Incube o tubo em temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

7. Coloque o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incube durante exatamente 1 hora. Não abra a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

8. No final do período de incubação (1 hora), remova o tubo do bloco de aquecimento e imediatamente analise com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

## REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de DNA

É necessário um dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável para cada amostra. Abrir e remover os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico, contendo no cartucho *amplicon* um bulbo com tampão e a câmara de detecção, contendo a tira de fluxo lateral (Fig. 1).

1. Verificar se o bulbo contém o tampão.

2. Identificar cada dispositivo com o número da amostra.

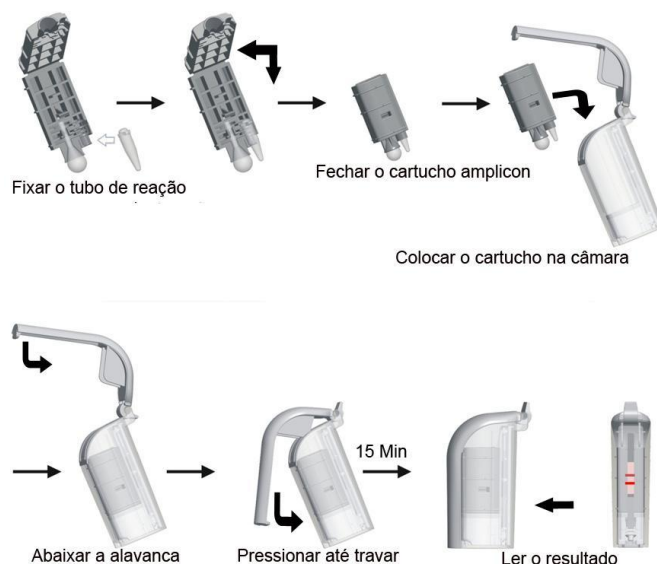
3. Fixar a seção da tampa do tubo de reação no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para prender o tubo de reação no cartucho *amplicon* (Fig. 1).

4. Feche bem o cartucho *amplicon*. Colocar o cartucho na câmara de detecção com o bulbo virado para baixo e para frente do dispositivo.

5. Empurrar a alavanca para baixo para travar o dispositivo.

6. Leia os resultados aos 15 minutos. Resultados lidos depois de 30 minutos são inválidos.

FIG. 1



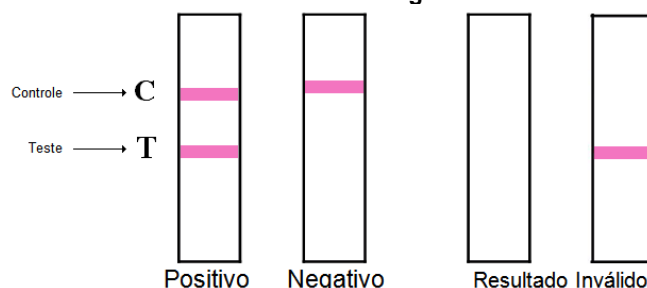
## LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

Para que o resultado seja válido, devem-se observar os seguintes requisitos (Fig. 2):

1. **Resultado Positivo** - Duas bandas aparecem, a linha de controle superior e a linha de ensaio inferior. O surgimento de ambas as linhas (a de controle e a linha do teste) indica a presença do DNA de *Anaplasma platys*.

2. **Resultado Negativo** - Uma única linha de controle aparece. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. O teste será inválido se a linha de controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do DNA de *Anaplasma platys*, ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

Fig. 2



## LIMITAÇÕES

Como acontece com qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCRun® deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

## SENSIBILIDADE

Este teste pode detectar 10<sup>3</sup> cópias do gene alvo no DNA purificado.

## REFERÊNCIAS

1. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophilum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (6), 2145-2165.
2. Lima, M.L.F.J.; Soares, P.T.; Ramos, C.A.N.; Araújo, F.R.; Ramos, R.A.N.; Souza, I.L.F.; Faustino, M.A.G.; Alves, L.C.A (2010). Molecular detection of Anaplasma platys in a naturally-infected cat in Brazil. Braz. J. Microbiol. vol.41 no.2 São Paulo
3. Renata Fernandes Ferreir; Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira; Ananda Müller Pereira; Cecília Matheus Guimarães; Alexandre Garcia de Sá, Fabricio da Silva Abreu; Carlos Luiz Massard; Nádia Regina Pereira Almosny (2007). Anaplasma platys Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. Intern J Appl Res Vet Med • Vol. 5, No. 3.



### Importador e Distribuidor Exclusivo:

JMR Trading Ltda/VP Diagnóstico. CNPJ: 11.857.347/0001-71  
Registro no MAPA: PR 000017-5  
Rua Mandaguari, 1752, Pinhais, PR. Brasil, CEP: 83.325-015  
Resp Téc.: Margareth Carvalo S. Agottani (CRMV-PR 3288)  
SAC: info@vpdiagnostico.com.br / www.vpdiagnostico.com.br  
PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO – NÃO NECESSITA DE REGISTRO

### Fabricante:

Biogal Galed Labs  
Kibbutz Galed, 1924000  
Tel: +972-4-9898605  
www.biogal.com

